

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **01015656 A**(43) Date of publication of application: **19.01.89**

(51) Int. Cl.

G01N 33/53
G01N 33/557
(21) Application number: **62171687**(22) Date of filing: **09.07.87**(71) Applicant: **NITSUSUI SEIYAKU KK**
(72) Inventor: **TANAKA TAKAYUKI**
SHIBATA HIDEAKI
HASEGAWA TERUAKI

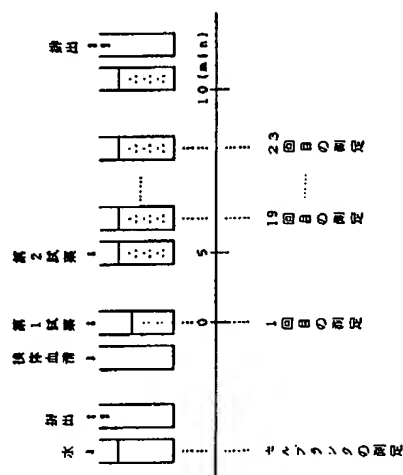
(54) **METHOD FOR QUANTIFYING C REACTIVE
 PROTEIN**

COPYRIGHT: (C)1989,JPO&Japio

(57) Abstract:

PURPOSE: To accurately quantity C reactive protein by utilizing a general-purpose biochemical automatic analyser, by adding an anti-C reactive protein IgG antibody to a specimen and measuring the change quantity of absorbancy dye to generated fluoccculation.

CONSTITUTION: A nonionic surfactant for shortening a measuring time due to the promotion of flocculation is used and an specimen is held to a definite pH range and the first reagent consisting of a buffer solution for preventing turbidity, a preservative and inorg. salt is added to the specimen serum and, next, the second reagent containing an anti-C reactive protein IgG antibody is added. Absorbancy is measured at every predetermined time and the change of absorbancy in a period when a fluoccculation forming amount almost increase primarily is measured. Then, a calibration curve is used to quantity C reactive protein from the change amount of absorbancy and C reactive protein mass is calculated using a biochemical automatic analyser.



⑫ 公開特許公報(A)

昭64-15656

⑮ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和64年(1989)1月19日

G 01 N 33/53
33/557X-7906-2G
7906-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑭ 発明の名称 C反応性タンパクの定量法

⑰ 特 願 昭62-171687

⑱ 出 願 昭62(1987)7月9日

⑲ 発 明 者	田 中 貴 幸	東京都豊島区巣鴨2丁目11番1号	日水製薬株式会社内
⑲ 発 明 者	柴 田 英 昭	東京都豊島区巣鴨2丁目11番1号	日水製薬株式会社内
⑲ 発 明 者	長 谷 川 輝 明	東京都豊島区巣鴨2丁目11番1号	日水製薬株式会社内
⑲ 出 願 人	日水製薬株式会社	東京都豊島区巣鴨2丁目11番1号	
⑲ 代 理 人	弁理士 有賀 三幸	外2名	

明 細 書

1 発明の名称

C反応性タンパクの定量法

2 特許請求の範囲

1. 検体に抗C反応性タンパクIgG型抗体を添加し、生じた凝集による吸光度変化量を測定することを特徴とするC反応性タンパクの定量法。

2. 非イオン性界面活性剤の存在下、検体に抗C反応性タンパクを添加する特許請求の範囲第1項記載のC反応性タンパクの定量法。

3. 非イオン性界面活性剤がフェニル基を有するポリオキシエチレンエーテル系界面活性剤である特許請求の範囲第2項記載のC反応性タンパクの定量法。

4. 吸光度変化量の測定を、抗C反応性タンパ

クIgG型抗体の添加後0～15分の間の単位時間当りの吸光度変化量の測定として行なり特許請求の範囲第1～3項のいずれかに記載のC反応性タンパクの定量法。

3 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明はC反応性タンパク(以下「CRP」と略称する)の定量法に関し、更に詳細には、免疫比濁法を改良した、自動分析に適するCRPの定量法に関する。

〔従来の技術〕

CRPは人血清中にあつて、肺炎及球菌菌体多糖類(C物質)と反応するタンパクであり、β-グロブリン分画中に存在するが、正常人

血清中には認められず、炎症あるいは組織崩壊が起こると速やかに血液中に現われてくる。このため、血清中のCRP量を測定することにより、各種の化膿性疾患及びその感染症、リウマチ熱、リウマチ様関節炎、その他の膠原病、心筋梗塞、悪性腫瘍などの診断が可能であり、特にリウマチ性疾患では活動性の判定、治療効果および予後の診断に有用である。

従来、CRP量を測定する方法としては、CRPが抗原性を有することを利用し、例えば抗体である抗CRP抗体を担体ラテックスに感作し、抗原抗体反応をラテックスの凝集として自動分析機により検出してCRP量を測定するラテックス比濁法；スライドガラス上でCRPと抗CRP抗体を単体ラテックスに感作し

などの問題がある。

また、ラテックススライド凝集法は目視による方法であるため、測定の自動化が困難であるという問題がある。

更に、免疫一元拡散法は実施に長時間を要し、測定の自動化も困難であるという問題がある。

更にまた、エンザイムイムノアッセイ法では実施に際して高価な酵素標識抗体を必然的に必要とし、しかも酵素の種類や鮮度に依存する誤差の発生があり、操作も複雑であるという問題を有している。

従つて、精度が高く、安価で、現在汎用の生化学用自動分析機に好適に適用できるCRPの定量法の開発が望まれていた。

抗原抗体反応せしめ、生じたラテックス凝集の量を肉眼により観察してCRP量を測定するラテックススライド凝集法；抗体である抗CRP抗体をアガロースゲルなどのゲル中に添加しておき、抗原抗体反応をゲル内沈降反応として見る免疫一元拡散法；プレートあるいはビーズに抗CRP抗体を固相化しておき、抗原CRPを反応させ、更に、抗CRP酵素標識抗体を反応させて反応した抗体の酵素量を測定するエンザイムイムノアッセイ法などが採用されてきた。

〔発明が解決しようとする問題点〕

しかしながら、ラテックス比濁法はラテックスの非特異的凝集により測定値がばらついたり、試薬の乾燥により自動分析機が詰まる

〔問題点を解決するための手段〕

本発明者らは上記問題点を解決すべく鋭意検討を行なつたところ、IgG型抗体とCRPの抗原抗体反応の初期における生成凝集の増加率はほぼ一定であり、CRPの濃度に依存することを見出し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、検体に抗CRP・IgG型抗体を添加し、生じた凝集による吸光度変化量を測定することを特徴とするCRPの定量法である。

本発明は、CRPを含む検体中に好ましくは過剰の抗CRP・IgG型抗体を添加し、抗原抗体反応により生じた凝集の吸光度変化量を測定することによりおこなわれる。

検体としては、各種体液が用いられるが、

一般には血清が好ましい。本発明において、検体への抗 CRP-IgG 型抗体の添加に際し、非イオン性界面活性剤を共存させておけば、凝集促進による測定時間の短縮、反応セルや試薬分注機構の洗浄の手間の軽減等の効果が得られる。この目的のために用いられる非イオン性界面活性剤としては、その HLB 値が 13 ~ 20 以上のものが好ましく、フェニル基を有するポリオキシエチレンエーテル系界面活性剤が特に好ましい。より具体的には例えばポリオキシエチレンオクタールフェニルエーテル (EO = 30 ~ 100 のもの)、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル (EO = 30 ~ 100 のもの) などが挙げられ、これらは単独で、または組み合わせて使用できる。

が均一となるよう攪拌を行なうことが必要である。

吸光度変化量の測定は、一般には 300 ~ 400 nm の波長でおこなわれる。また、本発明方法においては、凝集生成量がほぼ一次的に増加する時期における吸光度の変化を測定することが重要であるので、一般には反応開始後 0 ~ 15 分までに、好ましくは反応開始後 5 分以内に吸光度測定を終了させることが望ましい。また、測定用機器としては、光度計を有する汎用の自動分析機であればよく、特に限定されないが、もちろん手動で行なうこともできる。なお、本発明方法においてより精度を高めるためには、単位時間当たりの吸光度変化の測定値から最小二乗法によ

りまた、CRP と抗 CRP-IgG 型抗体との凝集反応系の好ましい温度範囲は室温ないし 40℃ 程度、pH 範囲は 4.5 ~ 8.5 であるので、本発明の実施には反応系をこの条件に適合させることが必要である。更に、抗 CRP-IgG 型抗体 (及び非イオン性界面活性剤) の検体への添加は、同時に行なつても、あらかじめ非イオン性界面活性剤を加えておいた検体中へ抗 CRP-IgG 型抗体を添加しても、いずれでも良く、これらのうち、抗 CRP-IgG 型抗体は、一般には、原液ないし 200 ~ 300 倍程度に希釈して用いることができ、非イオン性界面活性剤は 2 ~ 20 重量% 程度で用いられる。なお抗 CRP-IgG 型抗体 (及び非イオン性界面活性剤) の添加時及びその後においては、系

り吸光度変化量を求めれば良い。

本発明方法によれば、例えば検量線を用いることにより、吸光度変化量から CRP 量が求められる。検量線は、CRP を含まない検体液、例えば CRP を含まない血清と、濃度既知の CRP を含む標準血清を用いることにより容易に作成される。

本発明方法を容易に実施するためには、本方法を実施するために必要な成分、すなわち、必須成分である抗 CRP-IgG 型抗体のほか、非イオン性界面活性剤、検体の pH を一定範囲に保ち、検体の濁りを防ぐための緩衝液、防腐剤、無機塩等を含有する分析試薬用キットを利用すると有利である。

このような分析試薬用キットの一例を示せ

ば次の通りである。

第1試薬：

非イオン性界面活性剤	2~20重量%
防腐剤	0~0.2重量%
無機塩(NaCl、リン酸ナトリウム等)	0.5~3重量%
精製水	バランス
(緩衝液を用い、pHを5.5~8.0に保持する)	

第2試薬：

抗CRP-IgG型抗体	原液~200倍希釈
非イオン性界面活性剤	2~20重量%
防腐剤	0~0.2重量%
無機塩等	0.5~3重量%
緩衝液(pH5.5~8.0)	バランス

(発明の効果)

本発明方法によれば、ラテックス等の担体

や、酵素標識抗体を用いる必要がないため、酵素の種類、鮮度による誤差がなく、経済的にしかも簡便に、かつラテックス等の非特異的凝集による問題を伴わずにCRP量を測定することができる。

特に本発明方法は、反応の初期の段階の凝集の生成量変化を免疫凝集法により測定するものであるため、現在汎用の生化学用自動分析機に有利に利用することができるものである。

(実施例)

以下に実施例を挙げて説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例

CRPが陰性の血清及びCRP濃度が2.0mg/

dlの血清により、CRP濃度0、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0(単位；各mg/dl)の血清を調製し、これらを用い下記方法により標準検量線を作成した。

(1) 使用機器

日立705型自動分析装置

(2) 試薬

(i) 第1試薬

リン酸緩衝液(pH7.2)	0.1M
NaCl	0.15M
アジ化ソーダ	0.1%

(ii) 第2試薬

HEPES緩衝液(pH7.2)	0.05M
NaCl	0.15M
アジ化ソーダ	0.1%
ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル	5.25%
抗ヒトCRP抗体・ヤギIgG型血清	10倍希釈

(3) 操作方法

上記機器及び試薬を用いて行なつた測定操作の概略を第1図に示す。まず反応セル中に水のみを入れた、セルブランクの340nmの吸光度を測定し、次いで水を排出後検体血清20μl及び第1試薬50μlを入れ、1回目の吸光度を測定した。以後20秒間隔で計31回、10分間にわたり測定した。ところでセルブランクの吸光度は、装置内の演算機構により自動的に各測定値より差し引かれる。第1試薬の添加5分後に第2試薬350μlを添加し、反応を開始させた。

上記各測定値の内、第19~23回目(第2試薬添加後1分~2分20秒)に測定された吸光度を採り、最小二乗法により単位時間

当たりの吸光度変化量を算出した。

(4) 標準検量線の作成

前記した7種の血清20 μ Lずつを用い、上記操作方法に従って単位時間当たりの吸光度変化量 ($\Delta m_{\text{ABS}} \times 10 / \text{min}$) を求め、CRP濃度との関係をプロットして標準検量線を作成した。これを第2図に示す。

(5) 従来法との比較

上記で用いたのと同じ血清について、抗CRP混合抗体を用い、ツープイント・エンド・アッセイ(5分間)を用いて測定した結果を第3図に示す。この結果から明らかなように、従来法では吸光度変化量とCRP濃度の関係の間には大きなバラツキがあり、定量法として使用することは不可能である。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、自動分析装置による吸光度測定手順の概略を示す図面であり、第2図は、標準検量線を示す図面である。第3図は、従来法により求めたCRP濃度と吸光度変化量の関係を示す図面である。

以上

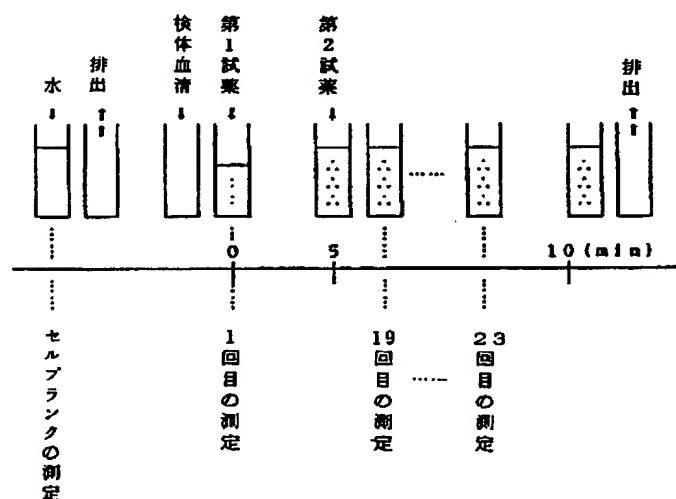
出願人 日水製薬株式会社

代理人 弁理士 有賀三幸

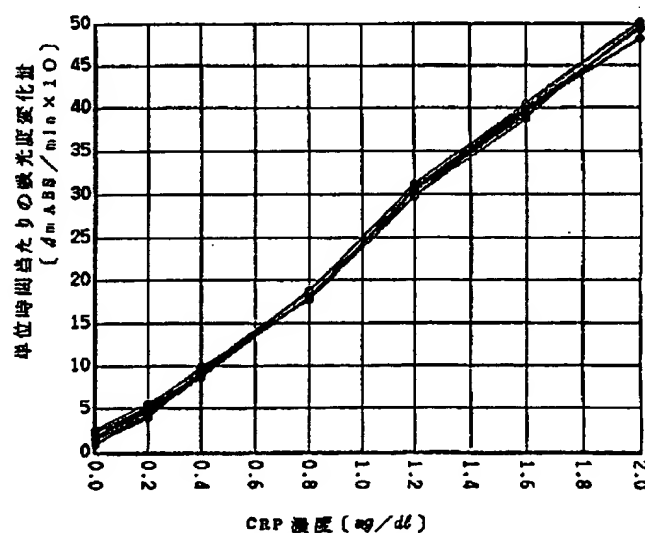
弁理士 高野登志雄

弁理士 小野信夫

第1図



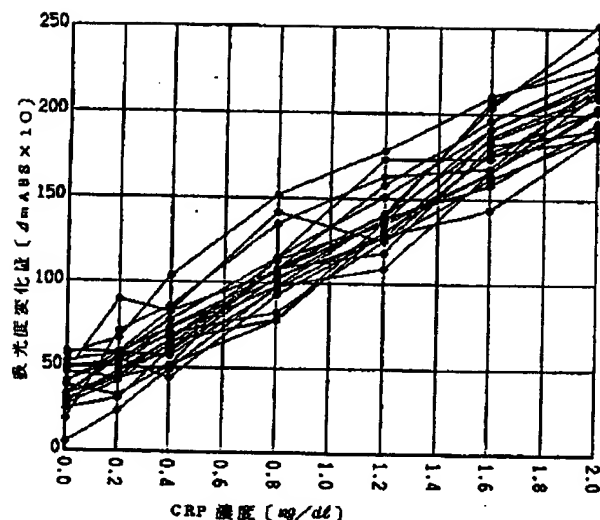
第2図



昭和62年6月10日

特許庁長官小川邦夫 殿

第3図



6 補正の対象

明細書の「特許請求の範囲」の欄

7 補正の内容

- (1) 明細書の特許請求の範囲を別紙の通り訂正する。

1. 事件の表示

昭和62年特許願第171687号

2. 発明の名称

C反応性タンパクの定量法

3. 補正をする者

事件との関係 出願人

名称 日水製薬株式会社

4. 代理人

住所 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号(〒103)
共同ビル 電話(669)090400

氏名 (6870) 弁理士 有賀三幸

住所 同上

氏名 (7756) 弁理士 高野登志雄

住所 同上

氏名 (8632) 弁理士 小野信夫

5. 補正命令の日付

自 発

特許請求の範囲

1. 検体に抗C反応性タンパクIgG型抗体を添加し、生じた凝集による吸光度変化量を測定することを特徴とするC反応性タンパクの定量法。
2. 非イオン性界面活性剤の存在下、検体に抗C反応性タンパクIgG型抗体を添加する特許請求の範囲第1項記載のC反応性タンパクの定量法。
3. 非イオン性界面活性剤がフェニル基を有するポリオキシエチレンエーテル系界面活性剤である特許請求の範囲第2項記載のC反応性タンパクの定量法。
4. 吸光度変化量の測定を、抗C反応性タンパクIgG型抗体の添加後0～15分の間の単位

時間当りの吸光度変化量の測定として行なり

特許請求の範囲第1～3項のいずれかに記載

のC反応性タンパクの定量法。